

# Acidos Nucleicos y Ciclo Celular



# La Citometría de Flujo nos da información sobre:

- El contenido de DNA:
  - Ciclo Celular (efecto de drogas sobre el ciclo)
  - Ploidía
  - Fracción de Fase S
  - Apoptosis
  - Estimación del tamaño genómico (plantas)
- Actividad proliferativa de una población celular
- Cariotipo
- Contenido de RNA: estudio de reticulocitos y plaquetas reticuladas

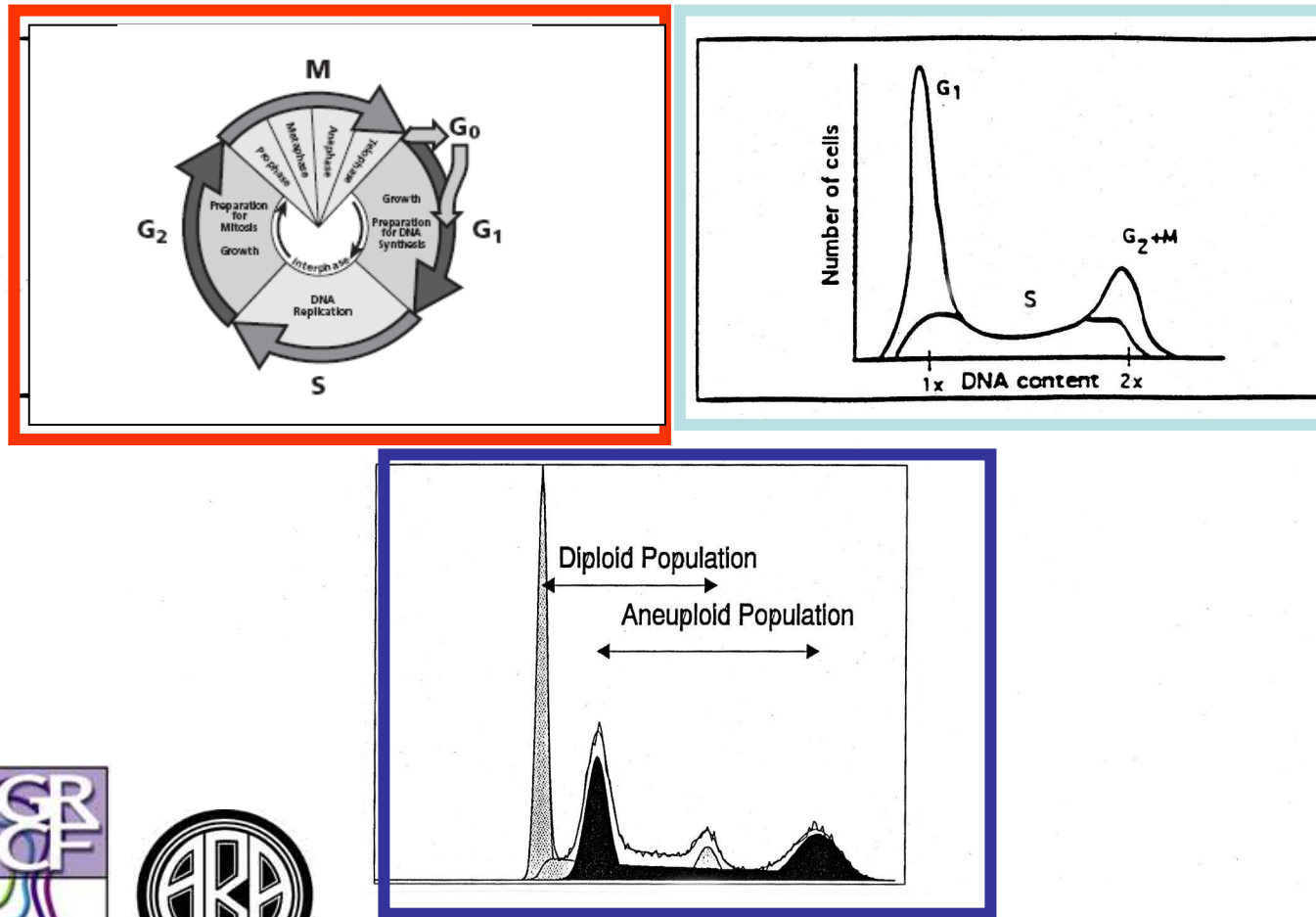
Permite el estudio conjunto con marcadores de superficie o antígenos Internos: **“Análisis multiparamétrico”**

Estos datos son importantes para determinar pronóstico en  
Algunas enfermedades y monitorear la respuesta al tratamiento



**Ciclo Celular:** es el intervalo entre dos mitosis consecutivas

## CICLO CELULAR Y CONTENIDO DE DNA



## **Requerimientos específicos del colorante a utilizar** **para el estudio de los ácidos nucleicos**

- 1- Deben unirse solo a ácidos nucleicos presentes en la célula porque ocasionarían inmunofluorescencia no específica
- 2- Deben tener cierto grado de selectividad entre DNA y RNA. Esto puede solucionarse con el uso de RNAsa
- 3- Deben unirse al ácido nucleico en forma estequiométrica
- 4- Debe teñir al ácido nucleico con fuerte intensidad



| <b>Forma de Unión</b>                                                       | <b>Sonda</b>                               | <b>Penetrabilidad</b>                                    | <b><math>\lambda</math> Excit</b> | <b><math>\lambda</math> Emis</b> | <b>Aplicaciones</b>                         |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Unión preferencial a bases</b>                                           | <b>Hoechst (AT)</b>                        | 33342: Perm<br>33258: No perm                            | <b>350 (UV)</b>                   | <b>450</b>                       | <b>Ciclo Cariotipo</b>                      |
|                                                                             | <b>DAPI (AT)</b>                           | <b>Perm</b>                                              | <b>340 (UV)</b>                   | <b>500</b>                       | <b>Ciclo</b>                                |
|                                                                             | <b>Cromomicina A3 (GC)</b>                 |                                                          | <b>440</b>                        | <b>455-500</b>                   | <b>Ciclo Cariotipo</b>                      |
| <b>Intercalantes</b>                                                        | <b>Ioduro de Propidio</b>                  | <b>Imperm</b>                                            | <b>342-515</b>                    | <b>610 FL-2 FL-3</b>             | <b>Viabilidad Ciclo Ploidia/Cont de DNA</b> |
|                                                                             | <b>7AAD</b>                                | <b>Imperm</b>                                            | <b>488</b>                        | <b>670 FI-3</b>                  | <b>Viabilidad Ploidía</b>                   |
|                                                                             | <b>Cianinas TOTO YOYO</b>                  | <b>Imperm</b>                                            | <b>488 457</b>                    | <b>565 550</b>                   | <b>Viabilidad Ciclo Ploidia/Cont de DNA</b> |
| <b>Unión al RNA con un alto coeficiente de absorción, DNA y DNA desnato</b> | <b>Naranja de Thiazol</b>                  | <b>Perm</b>                                              | <b>488</b>                        | <b>530</b>                       | <b>Reticulocitos Plaquetas reticuladas</b>  |
| <b>Metacromático</b>                                                        | <b>Naranja de acridina<br/>DNA<br/>RNA</b> | <b>Tratar con TritonX-100 para eliminar las histonas</b> | <b>488</b>                        | <b>530 FI-1<br/>650 FL-3</b>     | <b>Cinética de la replicación</b>           |

# Controles que deben ser utilizados:

## QC particles

### Beads

-Perlas homogéneas que permiten ajustar el CV de los picos de los histogramas a un valor menor igual a 2

**-Control de linealidad:** Verifica que la relación  $G2-M/G0-G1=2$   
Se utilizan Glóbulos Rojos de Pollo que tienden a la agregación

**-Control del pico diploide:**  
Se utilizan células linfocitarias

La adquisición debe ser

- En amplificación **LINEAL**
- Con flujo de baja velocidad: **LOW**



# Parámetros que caracterizan a una población celular

**DI:**

$$\frac{\text{IFM de la muestra problema}}{\text{IFM del control}}$$

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ población } \underline{\text{diploide}} \\ <1 \text{ población } \underline{\text{hipodiploide}} \\ >1 \text{ población } \underline{\text{hiperdiploide}} \end{array} \right\}$$

**SPF**

(Fracción de fase S) % de células en fase S

**PI**

(Indice proliferativo)

% de células en fase S + % de células en fase G<sub>2</sub>M

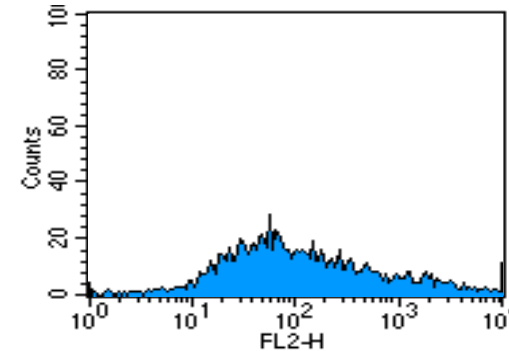
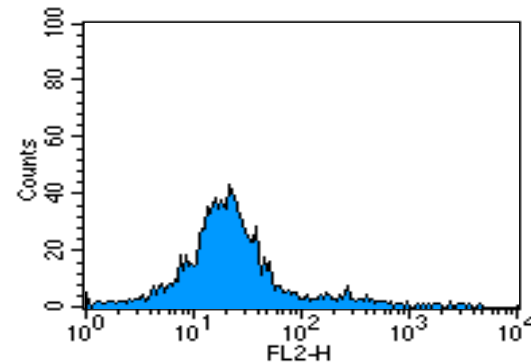


## El contenido de DNA puede estudiarse en:

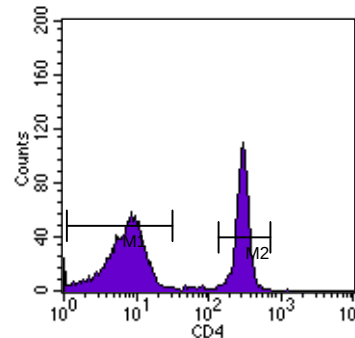
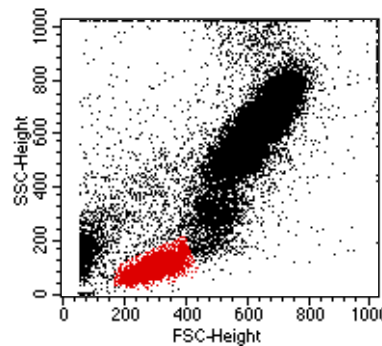
- Tejidos frescos, congelados o fijados
- Tejidos embebidos en parafina  
(permite realizar estudios retrospectivos)
- Suspensión de células permeabilizadas (Ethanol 70%;  
0.1% de Triton X-100)
- Núcleos aislados con detergentes (1% de Triton X-100, saponina,  
Enzimas)



# Coeficiente de variación



Es el cociente entre el Desvío Estándar de la muestra y la Media de Fluorescencia expresado como porcentaje



$$CV \text{ en M2} = \frac{49.92}{281.72} \times 100$$

$$CV = 17.72$$

Histogram Statistics

Gate: G1  
Total Events: 39629

Gated Events: 9946  
X Parameter: FL1-H CD4 (Log)

| Marker | Left, Right | Events | % Gated | % Total | Mean   | SD     | CV     | Median | Peak Ch |
|--------|-------------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|
| All    | 1, 9910     | 9946   | 100.00  | 25.10   | 122.73 | 138.86 | 113.14 | 12.08  | 281     |
| M1     | 1, 33       | 5682   | 57.13   | 14.34   | 8.02   | 3.94   | 49.09  | 7.64   | 8       |
| M2     | 146, 737    | 4145   | 41.68   | 10.46   | 281.72 | 49.92  | 17.72  | 281.33 | 281     |

## POBLACION CERCANA A LA POBLACION DIPLOIDE

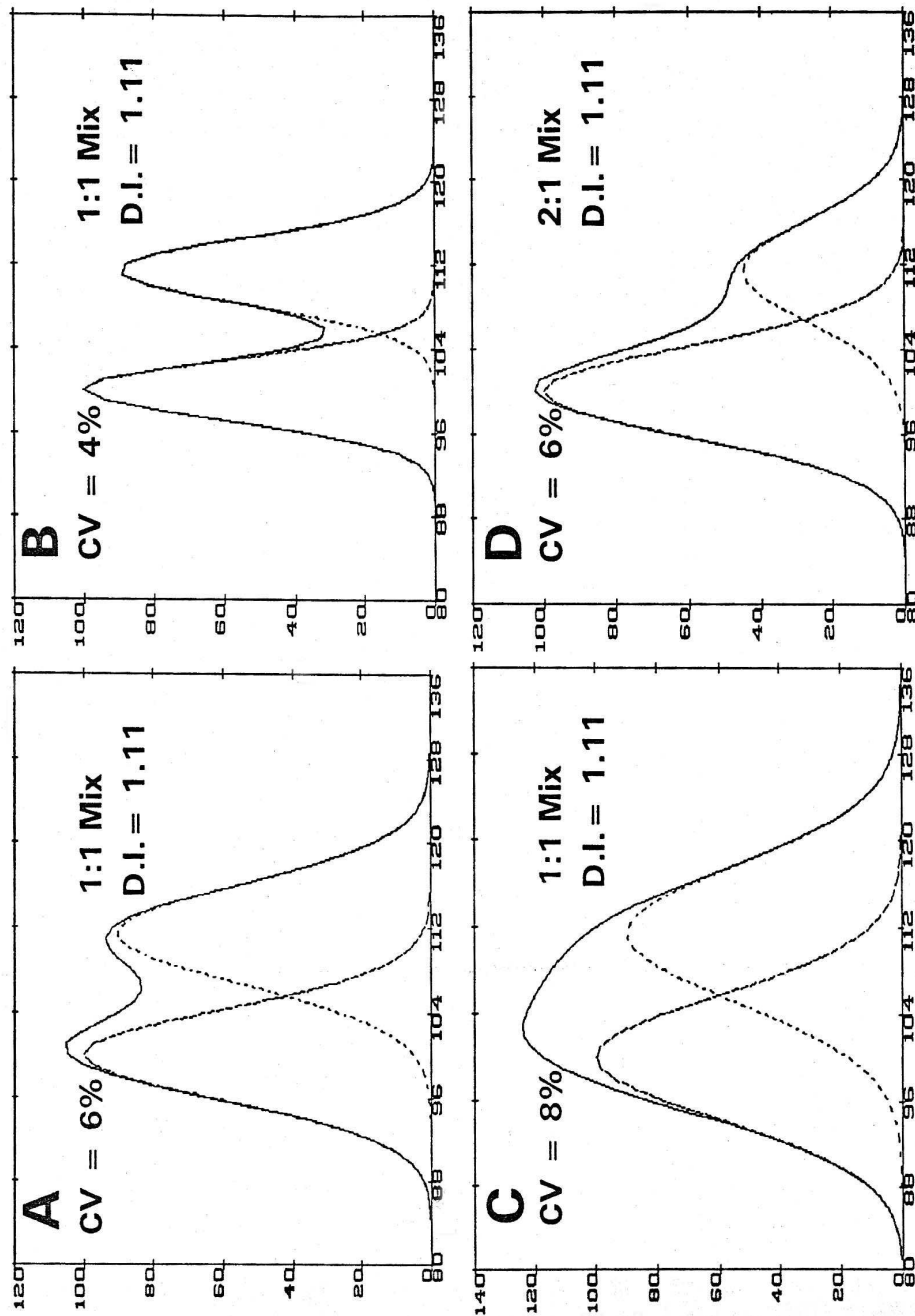
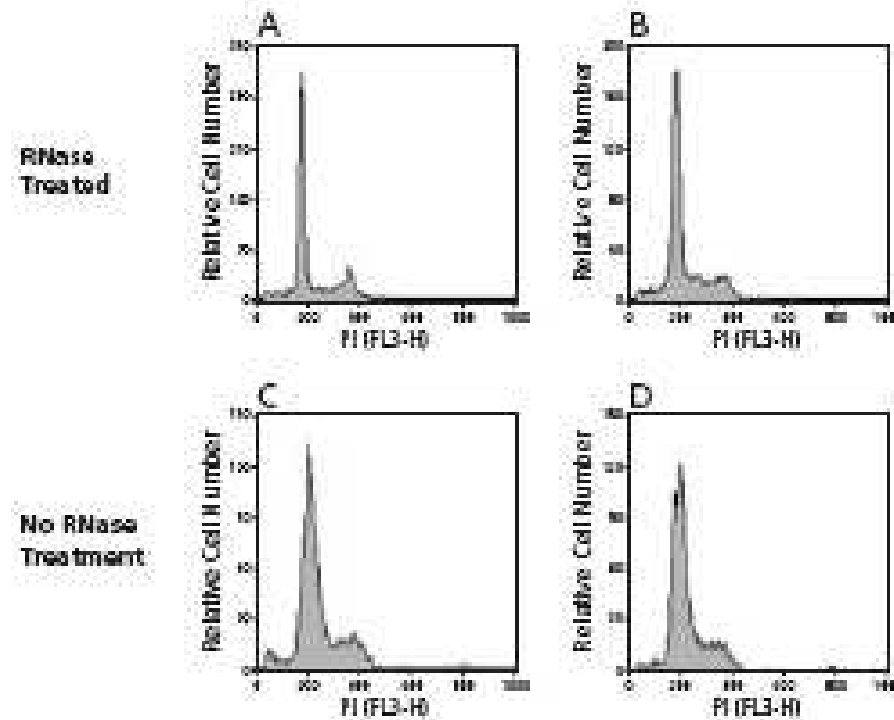


Figure 8.5. Demonstration of the effect of CV and proportion of aneuploid cells on discrimination of an aneuploid population. When the diploid and aneuploid cells are in a 1:1 ratio and the DI is 1.1, then bimodality is barely present at a CV of 6 (A), is quite easily apparent with a CV of 4 (B), but is not present with a CV of 8 (C). When the aneuploid cells are only 33% of the total, bimodality is not seen with a CV of 6 (D).

## Disminución del CV después del tratamiento con RNAsa en dos Líneas celulares



## LOS RESTOS CELULARES ALTERAN LA FASE S

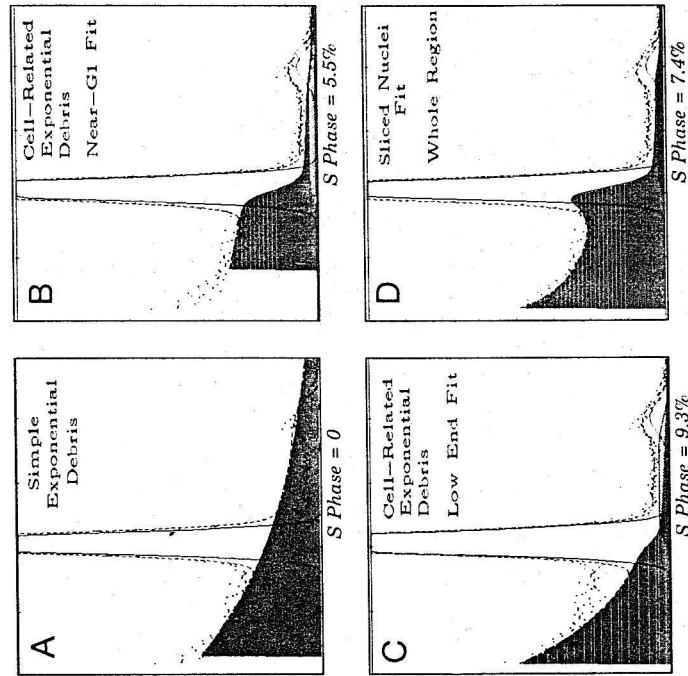
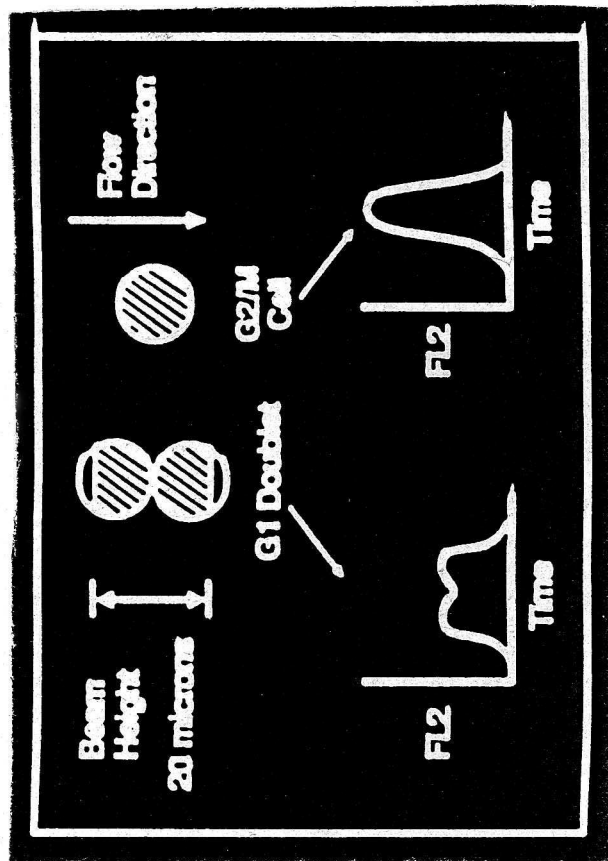
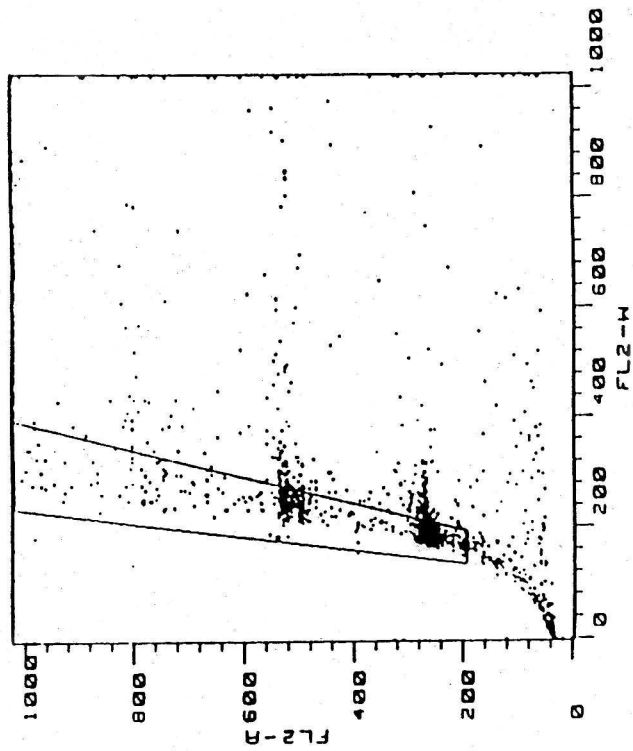


**Figure 8.7.** Fitting of a histogram derived from paraffin-embedded diploid cells using a simple exponential background debris curve (A), a model that assumes that exponential debris is produced by each cellular component of the histogram (B) and (C), and the sliced-nuclei model (D). B shows fitting of the background in a region closer to the G<sub>1</sub> peak, C shows fitting of a more leftward region of the histogram, and D shows fitting to a wide region of the debris left of the G<sub>1</sub> peak. Cell cycle analyses in this and other figures were performed using the "Multicycle" software written by the author (Phoenix Flow System: San Diego, CA).

# DISCRIMINACION DE DOBLETES



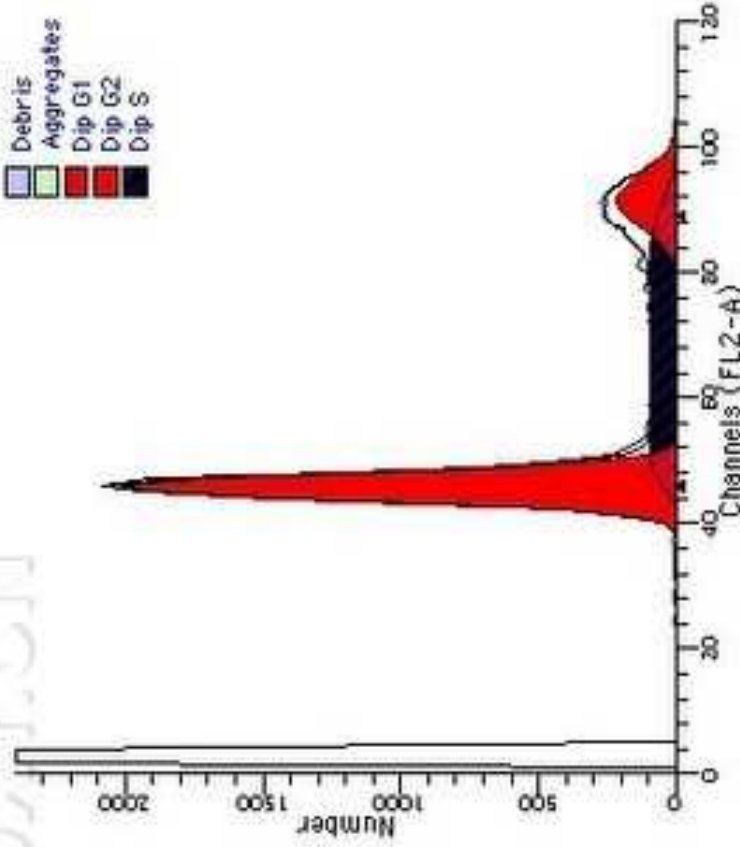
**El análisis se realiza con programas especiales que emplean  
modelos matemáticos**

**Modfit  
(ajuste al modelo)**



DAYLGN

Debris  
Aggregates  
Dip G1  
Dip G2  
Dip S



File analyzed: HT29-P61.024  
Date analyzed: 18-Jun-2007  
Model: IDAOn\_DSf  
Analysis type: Manual analysis

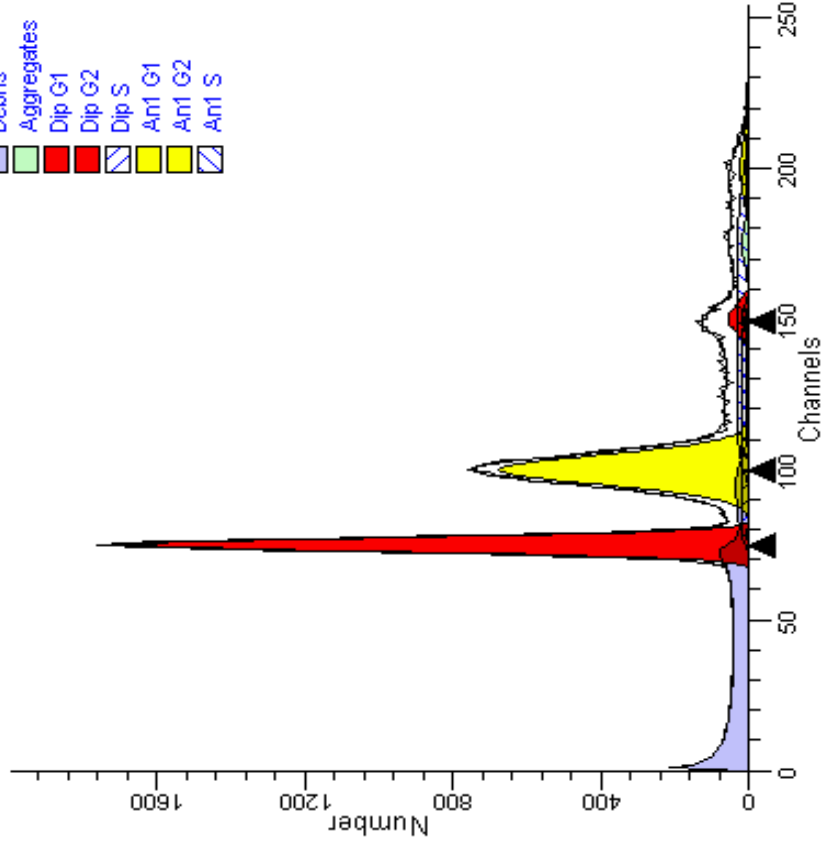
Diploid: 100.00 %  
Dip G1: 61.20 % at 45.76  
Dip G2: 13.07 % at 91.43  
Dip S: 25.73 % G2/G1: 2.00  
%CV: 4.54

Total S-Phase: 25.73 %  
Total B.A.D.: 0.12 %

Debris: 0.48 %  
Aggregates: 0.06 %  
Modeled events: 17525  
All cycle events: 17431  
Cycle events per channel: 373  
RCS: 1.901

DAYLGN

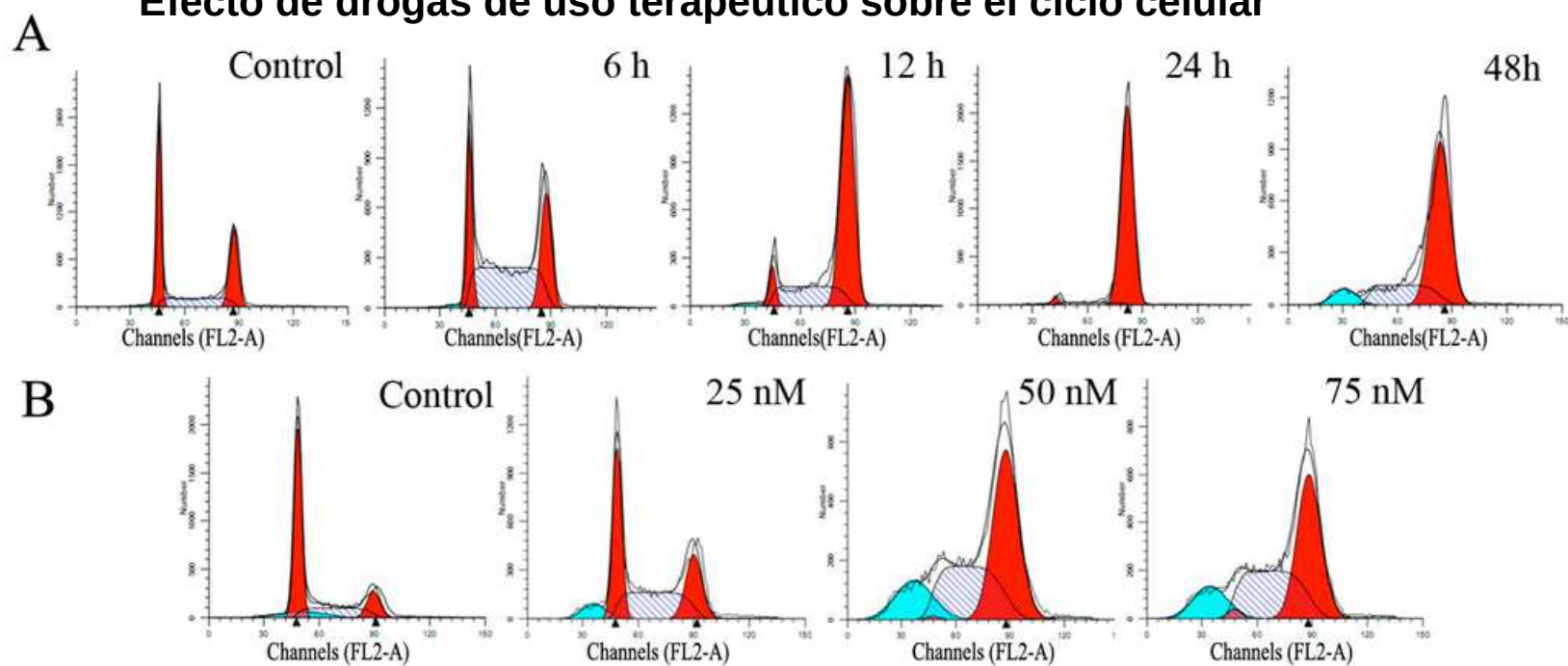




File analyzed: SAMPLE2.FCS  
 Date analyzed: 13-Aug-2010  
 Model: 2DA0n\_DSD\_ASD  
 Analysis type: Automatic analysis  
 Ploidy Mode: First cycle is diploid  
 Diploid: 49.78 %  
 Dip G1: 80.08 % at 75.02  
 Dip G2: 5.53 % at 150.05  
 Dip S: 14.39 % G2/G1: 2.00  
 %CV: 3.00  
 Aneuploid 1: 50.22 %  
 An1 G1: 69.92 % at 99.87  
 An1 G2: 5.22 % at 199.74  
 An1 S: 24.86 % G2/G1: 2.00  
 %CV: 4.97 DI: 1.33  
 Total Aneuploid S-Phase: 24.86 %  
 Total S-Phase: 19.65 %  
 Total B.A.D.: 11.38 %  
 Debris: 19.13 %  
 Aggregates: 4.14 %  
 Modeled events: 31236  
 All cycle events: 23967  
 Cycle events per channel: 191  
 RCS: 0.908



## Efecto de drogas de uso terapéutico sobre el ciclo celular



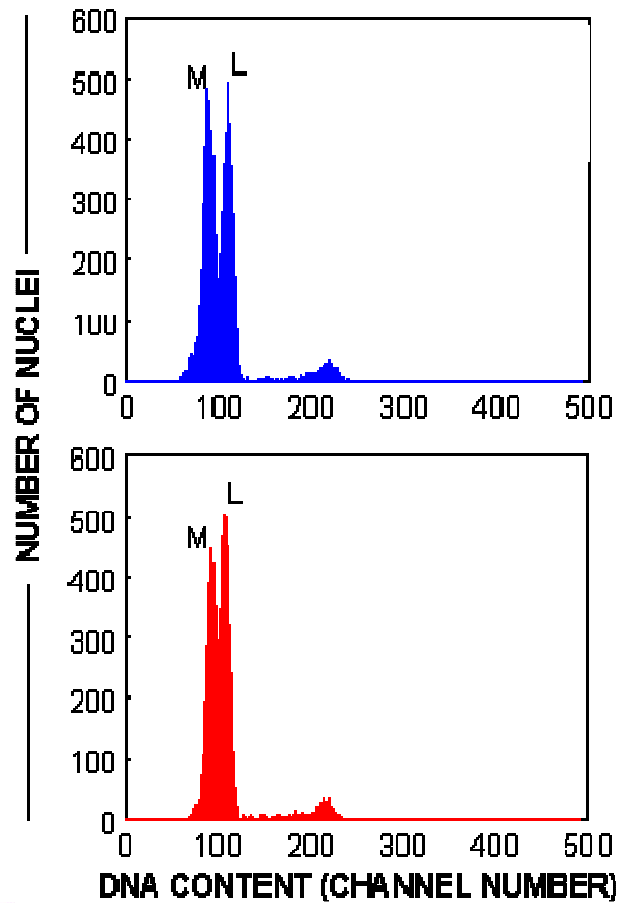
A: con respecto al tiempo

B: efecto de la concentración

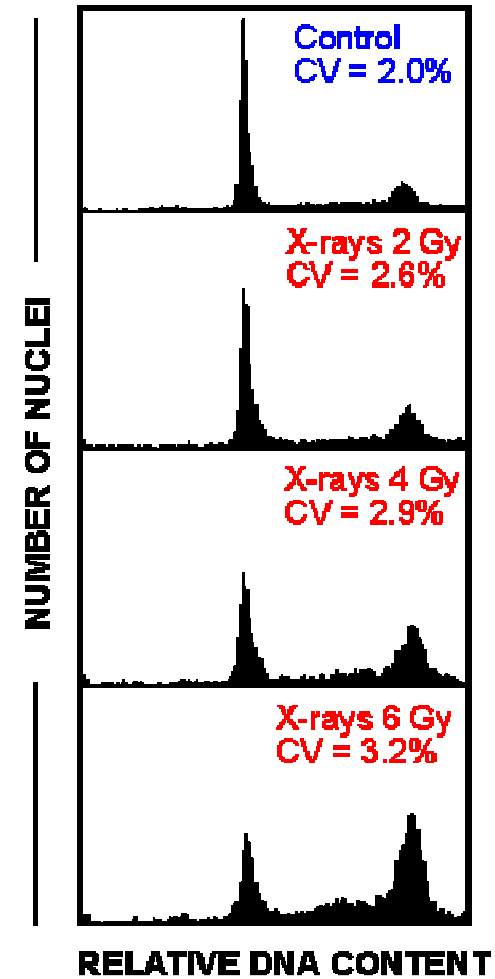
La droga produce un bloqueo en fase G2/M



Ploidía en células tumorales  
Ejemplo: aneuploidía cercana  
al pico diploide



Efecto de la radiación sobre el ciclo celular



# Proteínas asociadas a la proliferación celular

Reguladoras

Constituyentes de la estructura

**PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen.**  
G1 y S

**Ki-67: S y G2**

**p105: en el pasaje G0-G1 y en células en Mitosis**



## INCORPORACION DE BrdUrd COMO MARCADOR DE PROLIFERACION CELULAR

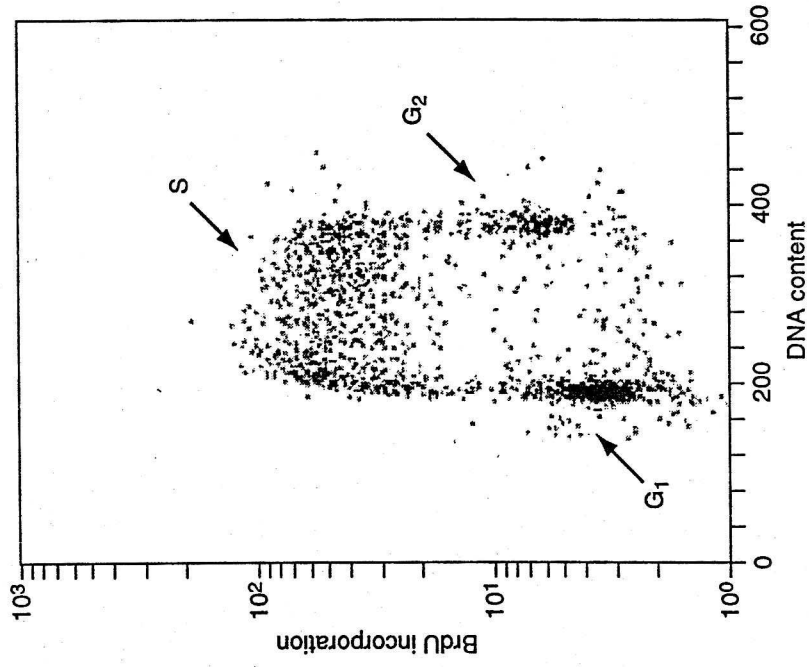
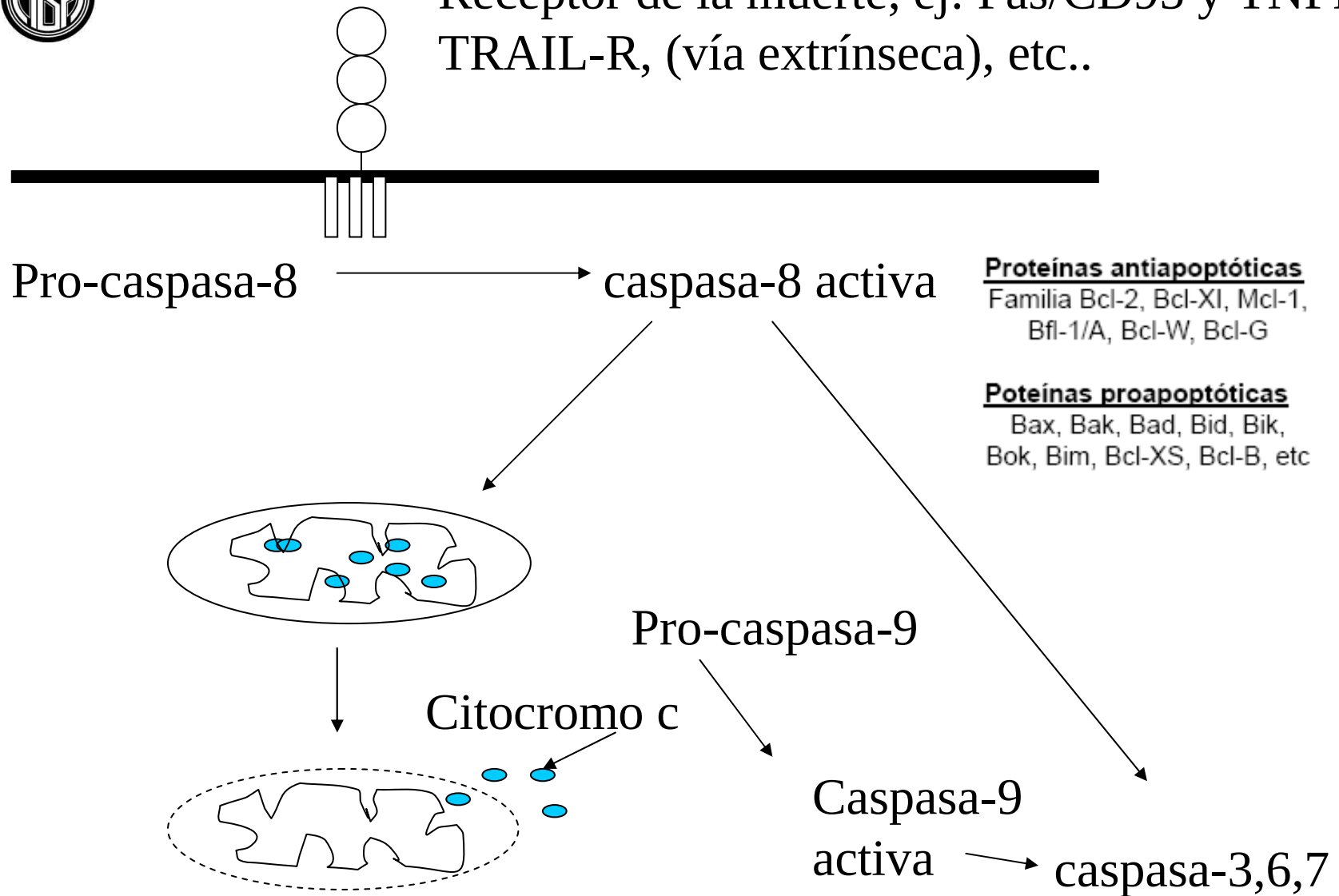


**Figure 7.7.1** Typical bivariate distribution of cells showing incorporation of BrdU versus DNA content. Exponentially growing HL-60 cells were incubated in the presence of BrdU for 30 min and then subjected to the procedure described in Basic Protocol 1.

# Apoptosis



Receptor de la muerte, ej: Fas/CD95 y TNFR, TRAIL-R, (vía extrínseca), etc..

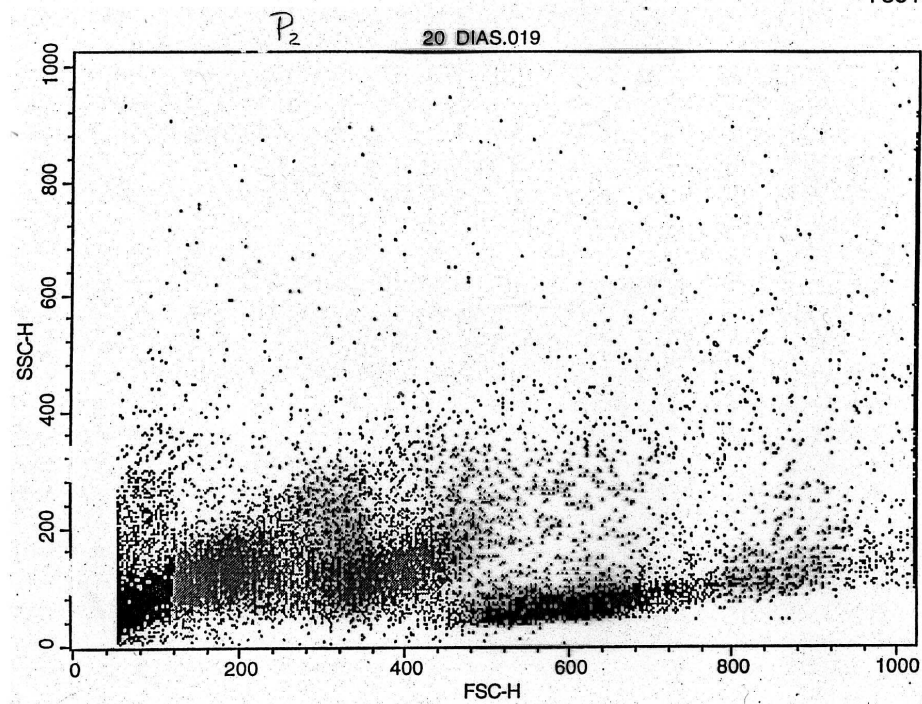
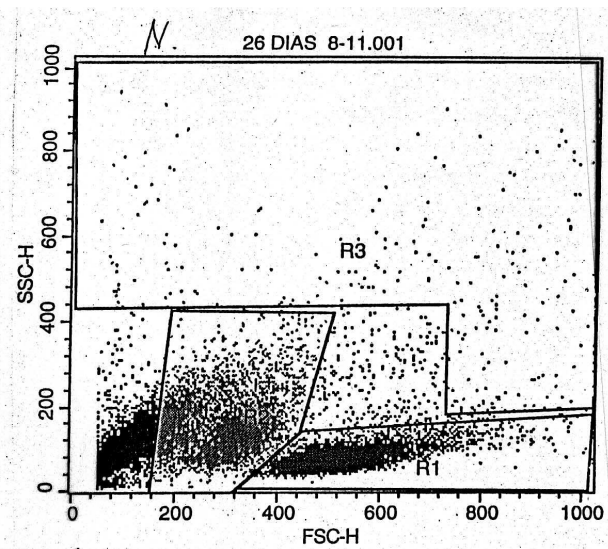
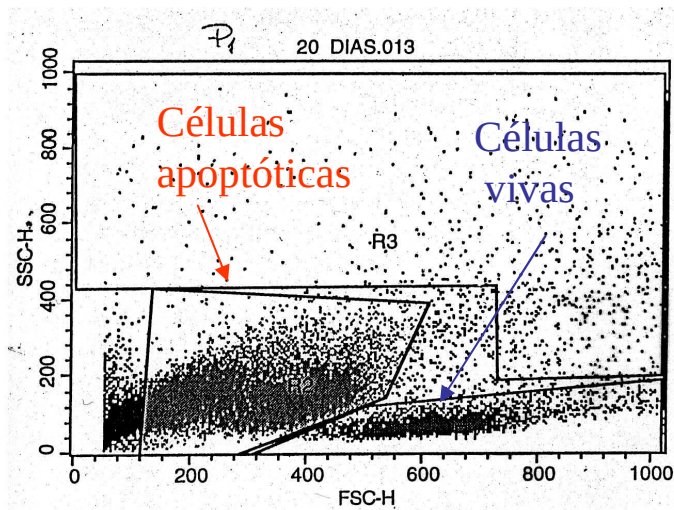


- Reorganización del citoesqueleto
- Exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática
- Ruptura del DNA

# **Algunas de las herramientas para estudiar por citometría de flujo células en apoptosis en sus distintos estadios**

- 1) **Cambios en el FSC-SSC**
- 2) **Cambios mitocondriales: TMR( tetrametilrodamina) Apop. Muy temprana**
- 3) **Niveles de moléculas pro-apoptóticas o anti-apoptóticas: con Ac-Mo**
- 4) **Nivel de Caspasas activas: con Ac-Mo**
- 5) **Detección de fosfatidilserina en la membrana plasmática:**  
**Con Annexina V conjugada. Apop. temprana**
  
- 6) **Fragmentación del ADN: Apop.tardía**  
**-Ioduro de Propidio (PI)**  
**-Incorporación de análogos de Nucleótidos a los extremos 3' OH terminal catalizado por TdT exógena, biotinilados o detectados con Ac Mo (Técnica de TUNEL)**
- 7) **Estudiar Receptores de Muerte en la superficie celular:**  
**Fas (CD95),TNFR1 y otros . Apop. por activación**





**Inducida con medio de cultivo  
suplementado con 1% de suero  
fetal bovino**

**IDENTIFICACION DE CELULAS APOPTOTICAS CON  
ANNEXINA V**

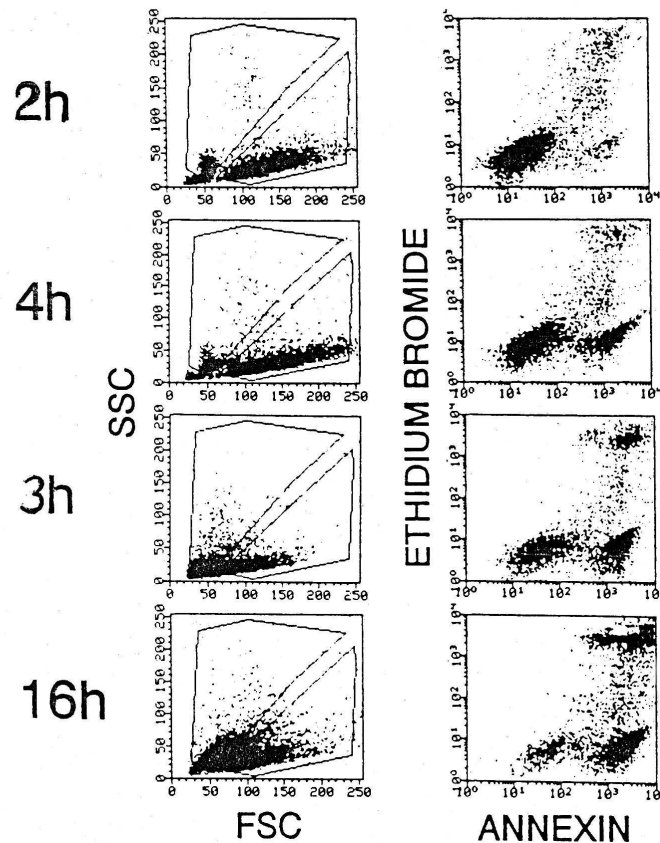
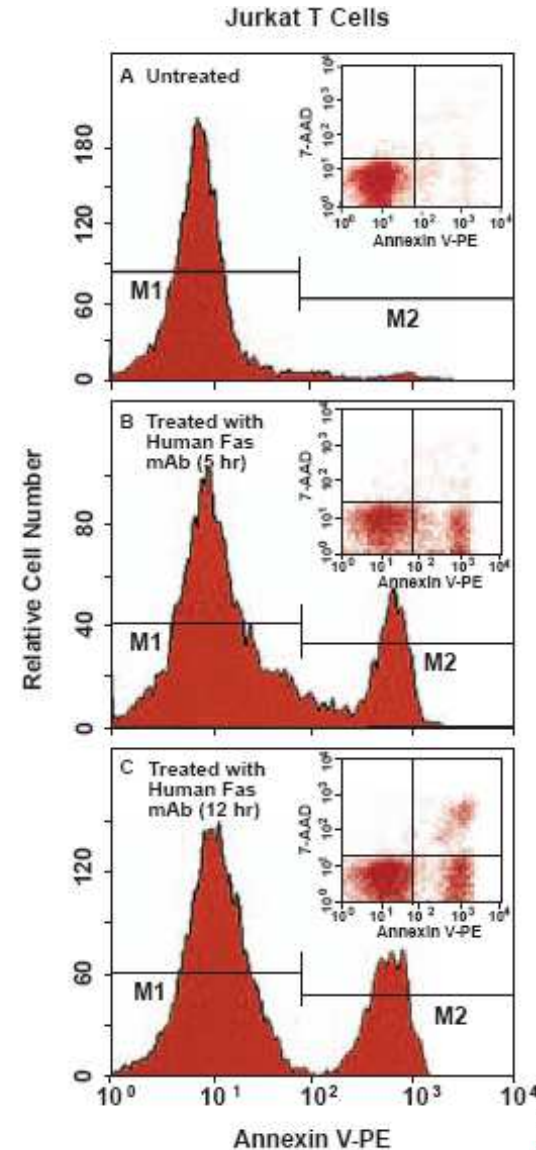
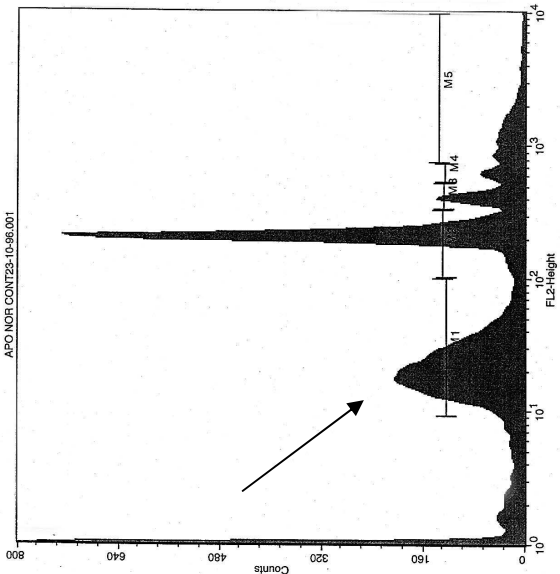


Fig 5. Flow cytometric analysis of apoptosis in germinal center B cells. Germinal center B cells were cultured at 1% FCS for 2, 4, 8, or 16 hours. Cells were washed in annexin buffer and directly analyzed after addition of annexin V<sup>FITC</sup> and EB. FSC (forward scatter)/SSC (side scatter) patterns (left) and annexin V/EB double staining (right) is shown. Representative experiment out of three.

**Inducida con anti-FAS**



APOPTOSIS



File: APO NOR CONT23-10-96.001

Sample ID: APO NOR CONT23-10-96.001

Patient ID: APO NOR CONT23-10-96.001

Case Number: APO NOR CONT23-10-96.001

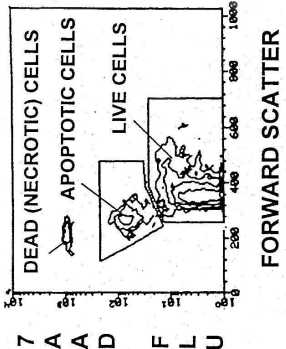
Acquisition Date: 23-Oct-96

Gated Events: 20000

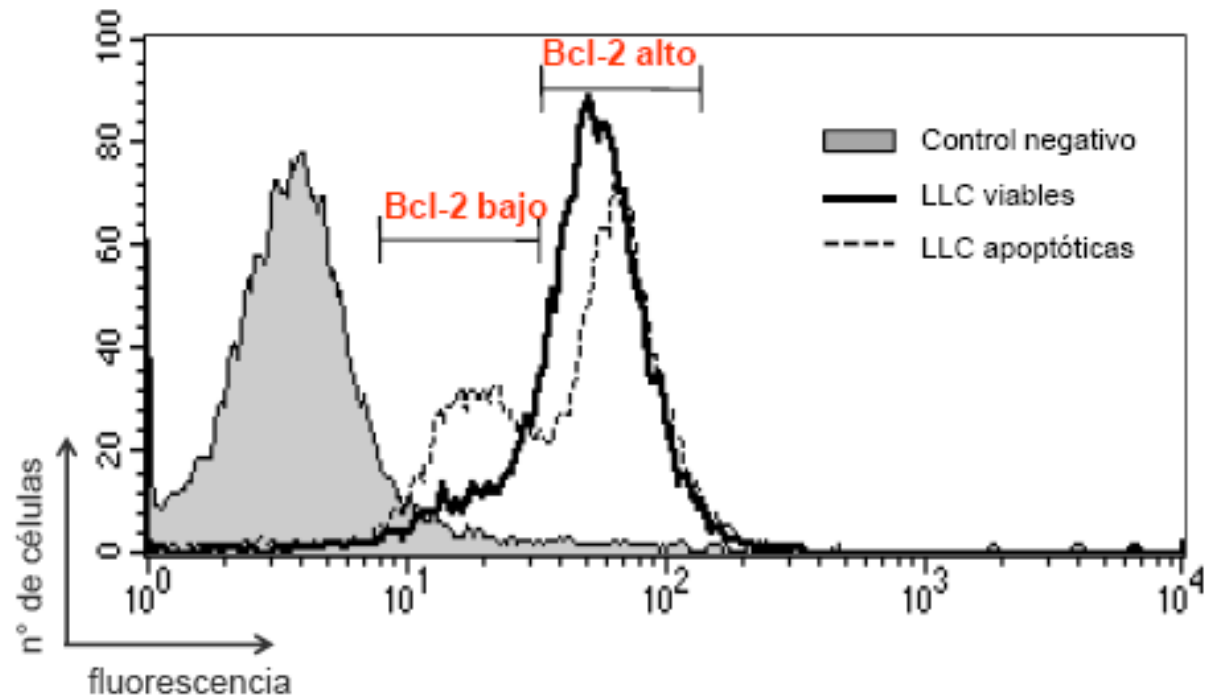
X Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Total Events: 20000

| Marker | Left | Right | Events | % Gated | % Total | Mean    | Geo Mean | CV    | Median  | Peak Ch |
|--------|------|-------|--------|---------|---------|---------|----------|-------|---------|---------|
| All    | 1    | 9647  | 20000  | 100.00  | 100.00  | 199.92  | 254.16   | 27.38 | 1       | 1       |
| M1     | 9    | 96    | 6344   | 31.72   | 31.72   | 25.11   | 22.12    | 58.09 | 20.54   | 19      |
| M2     | 96   | 316   | 5338   | 26.69   | 26.69   | 207.67  | 204.87   | 15.93 | 205.35  | 198     |
| M3     | 316  | 505   | 1005   | 5.03    | 5.03    | 403.46  | 401.48   | 9.97  | 392.42  | 392     |
| M4     | 505  | 698   | 514    | 2.57    | 2.57    | 601.99  | 599.83   | 8.45  | 604.30  | 604     |
| M5     | 723  | 9306  | 1248   | 6.24    | 6.24    | 1586.32 | 1351.01  | 75.15 | 1197.09 | 777     |



## Expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en células provenientes de un paciente con LLC



**Fin de clase 2**  
**Muchas gracias**

